



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets<sup>5</sup> :</b> CI2N 7/00, 5/08, 5/10 CI2N 15/38, 15/85, G01N 33/569 CI2P 21/08, A61K 39/21		<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 93/20188</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 14 octobre 1993 (14.10.93)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR93/00336 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 2 avril 1993 (02.04.93)		<b>(74) Mandataire:</b> CABINET GERMAIN & MAUREAU; B.P. 3011, F-69392 Lyon Cédex 03 (FR).	
<b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 92/04322 3 avril 1992 (03.04.92) 92/13443 3 novembre 1992 (03.11.92)		<b>FR</b> <b>FR</b>	<b>(81) Etats désignés:</b> CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
<b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> PERRON, Hervé [FR/FR]; 80, place des Géants, F-38100 Grenoble (FR). SEIGNEURIN, Jean-Marie [FR/FR]; Le Varvoux, F-38190 Bernin Cédex 49 (FR).		<b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
<b>(54) Title:</b> PROCESS AND CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF CELLS INFECTED BY A MULTIPLE SCLEROSIS ASSOCIATED VIRUS <b>(54) Titre:</b> PROCEDE ET MILIEU DE CULTURE POUR L'OBTENTION DE CELLULES INFECTEES PAR UN VIRUS ASSOCIE A LA SCLEROSE EN PLAQUES <b>(57) Abstract</b> <p>Process for in vitro production of a culture or cell line infected by a viral strain associated with multiple sclerosis. According to the process, a sample is taken from a person with multiple sclerosis, the sample is cultivated in a medium promoting the growth of infected cells to obtain a culture of primary infected cells. A sample of the primary cell culture or a sub-culture of the latter is then cultivated in series, i.e. by means of successive cultures, in said culture medium to obtain the culture or cell line infected by a multiple sclerosis associated virus. The invention is characterized in that the culture medium further contains a beta anti-interferon antibody or antibody which is directed against an antigenically close molecule. Said antibody plays an inhibiting role in viral expression, has long-lasting expression and propagates the viral strain in the culture or cell line.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>Procédé d'obtention in vitro d'une culture ou lignée cellulaire infectée par une souche virale associée à la sclérose en plaques (SEP), selon lequel on effectue un prélèvement corporel sur un individu atteint de SEP, on cultive ledit prélèvement dans un milieu de culture favorisant la croissance des cellules infectées, pour obtenir une culture de cellules primaires infectées, et on cultive en série, c'est-à-dire par passages successifs, dans ledit milieu de culture, un prélèvement de la culture de cellules primaires, ou d'une sous-culture de cette dernière, pour obtenir la culture ou lignée cellulaire infectée par un virus associé à la SEP, caractérisé en ce que le milieu de culture contient en outre un anticorps anti-interféron bêta, ou dirigé contre une molécule antigéniquement proche, jouant un rôle inhibiteur dans l'expression virale, permettant d'exprimer de manière persistante et de propager la souche virale dans la culture ou lignée cellulaire.</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

PROCEDE ET MILIEU DE CULTURE POUR L'OBTENTION DE CELLULES  
INFECTEES PAR UN VIRUS ASSOCIE  
A LA SCLEROSE EN PLAQUES

La présente invention a pour objet un milieu pour  
5 la culture in vitro de cellules infectées par un virus  
présent chez des individus atteints de sclérose en  
plaques, un procédé pour l'obtention de cellules infectées  
utilisant ledit milieu et les lignées cellulaires  
infectées ainsi obtenues.

10 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie  
demyélinisante du système nerveux central (SNC) que l'on  
suspecte depuis plusieurs années être associée à un virus,  
bien que l'agent causal n'ait pas encore été déterminé  
avec certitude.

15 De nombreux travaux ont étayé cette hypothèse  
d'une étiologie virale de la maladie, mais aucun des virus  
connus testés ne s'est avéré être l'agent causal  
recherché.

Par la suite, l'observation chez des patients  
20 atteints de sclérose en plaques de phénomènes assimilables  
à une réaction d'auto-immunité a conduit à une hypothèse  
étiologique auto-immune "essentielle" (Lisak R.P.,  
Zweiman B. New Engl. J. Med. 1977; 297, 850-853, et  
Lassmann H. et Wisniewski H.M. Arch. Neurol. 1979; 36,  
25 490-497). Cependant, cette auto-immunité dirigée contre  
certains composants du système nerveux central s'est  
révélée peu spécifique de la SEP et fréquente dans des  
inflammations du SNC, associées ou non à une infection,  
comme cela a été montré par Hirayama M. et al.  
30 (Neurology 1986 ; 36, 276-8) Kenneth G. Warren et al.  
(Annals of Neurology 1986 ; 20, 20-25), Suzumura A. et al.  
(Journal of Neuroimmunology 1986 ; 11, 137-47) et  
Tourtelotte W. et al. (Journal of Neurochemistry 1986 ;  
46, 1086-93). De plus, comme l'a fait remarquer E.J. Field  
35 (The Lancet 1989 ; 1, 1272), aucune des thérapeutiques

immunosuppressives n'a permis d'obtenir des résultats décisifs contre la SEP.

Une hypothèse a été émise selon laquelle un rétrovirus serait à l'origine de la maladie. La découverte 5 par A. Gessain et al. (J. Infect. Disease 1988 ; 1226-1234), de syndromes neurologiques associés au virus HTLV-1, connu à l'origine comme agent de leucémies T de l'adulte, a conduit de nombreux auteurs tels que H. Koprowski et al. (Nature 1985 ; 318, 154), M. Ohta et 10 al. (J. Immunol. 1986 ; 137, 3440), E.P. Reddy et al. (Science 1989 ; 243, 529), S.J. Greenberg et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989 ; 86, 2878), J.H. Richardson et al. (Science 1989 ; 246, 821), S.L. Hauser et al. (Nature 1986 ; 322, 176) et A. Karpas et al. (Nature 15 1986 ; 322, 177), à rechercher une implication de ce rétrovirus humain dans la SEP, cependant sans succès ou avec des résultats évoquant des réactions croisées.

Il existe par ailleurs un modèle animal très proche de la SEP, induit par un rétrovirus : le virus 20 MAEDI-VISNA du mouton. Il est connu que l'infection naturelle par ce virus provoque une maladie ovine proche de la SEP, comme le rapportent Johnson R.T. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 66-67), Narayan O. et Cork L.C. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 89-98) et Nathanson N. et al. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82). L'infection expérimentale de moutons par inoculation intra-ventriculaire de souches neurovirulentes du virus VISNA a permis d'établir la responsabilité de ce virus dans la génèse de cette infection démyélinisante du mouton. Comme l'expliquent 25 Nathanson N. et al. (Rev. Infect. Dis. 1985 ; 7, 75-82), Hoffman P.M. et Panitch H.S. ("Handbook of Clinical Neurology, 12 ; Viral diseases" R.R. Mc Kendall, ed., Elsevier science Publishing, Amsterdam, 1989, 453-466) et A. Haase (Nature 1986 ; 322, 130-136), elle diffère 30 quelque peu de l'infection naturelle, mais reste néanmoins proche de la SEP. Il est par ailleurs intéressant de noter 35

que dans l'ensemble des travaux effectués sur ce sujet par les auteurs précités, le virus Visna est retrouvé dans les cellules de plexus choroïdes du cerveau des moutons infectés qui constituent un site de latence et de 5 réplication occasionnelle du provirus Visna ; la localisation de ces cellules à l'interface sang/liquide céphalo-rachidien expliquant certainement ce phénomène.

Tous ces résultats plaident en faveur du rôle dans la SEP d'un rétrovirus inconnu.

10 Récemment, les travaux de H. PERRON et al. (Res. Virol. 1989 ; 140, 551-561, et "Current concepts in multiple sclerosis" Wiethölter et al., eds. Amsterdam, Elsevier, 1991, p. 111-116 et The Lancet 1991 ; 337, 862-863) ont permis, à partir d'une ponction lombaire de 15 liquide céphalo-rachidien d'un patient souffrant de SEP d'isoler une lignée de cellules non lymphoïdes et de mettre en évidence la présence d'un virus, présentant les caractéristiques d'un rétrovirus et montrant en particulier une activité transcriptase inverse, dans le 20 surnageant de culture des cellules de cette lignée. L'étude au microscope électronique des cellules de cette lignée a permis de mettre en évidence des particules virales d'un diamètre compris environ entre 110 et 140 nm, la taille des particules variant selon qu'il s'agit de 25 particules matures ou immatures. Par ailleurs, une étude sérologique, selon la technique ELISA, utilisant un extrait cellulaire des cellules infectées de cette lignée, a permis de montrer, avec 40 sérum de patients parmi lesquels 20 sont atteints de SEP (SEP certaine) et 20 sont 30 des malades présumés (SEP probable), 60 % de résultats positifs. Une étude comparative avec 40 sérum de patients atteints d'autres maladies neurologiques que la SEP n'a donné que 5 % de résultats positifs. Cette lignée, que les auteurs ont dénommée LM7, est clonale et non-immortelle et 35 son étude immunocytochimique et ultrastructurale a permis de caractériser son origine leptoméningée.

Ce virus s'est avéré cependant très difficile à étudier, du fait que d'une part il s'exprime très faiblement, *in vitro*, dans la lignée cellulaire primaire d'origine leptoméningée, et que d'autre part cette lignée cellulaire dégénère assez rapidement après une trentaine de passages par extinction de son pouvoir mitotique, de sorte qu'elle ne permet plus l'expression virale.

Aussi, les auteurs ont envisagé une nouvelle approche (H. Perron et al., *The Lancet*, vol. 337, 862-863, 10 (1991)), qui consiste à prélever un échantillon sanguin chez un patient atteint de SEP, à effectuer une culture de monocytes et à recueillir le surnageant pour vérifier l'expression d'une activité transcriptase inverse, soit directement dans le culot d'ultracentrifugation, soit 15 après séparation à l'équilibre sur gradient de saccharose. Il a ainsi été montré un pic d'activité transcriptase inverse dans le surnageant chez les patients atteints de SEP et que cette activité est retrouvée dans la fraction de densité 1,17 g/ml environ. Une étude au microscope électronique des cellules infectées a permis de mettre en évidence des particules semblables à des rétrovirus de 100 à 120 nm qui sont retrouvées dans les culots d'ultracentrifugation de surnageants de cultures exprimant une activité transcriptase inverse élevée. Les 20 culots de centrifugation contenant des débris cellulaires et potentiellement des particules virales ont ensuite été cultivés sur des cellules du sang de cordon, pour la mise en évidence d'une expression virale. Cependant, comme expliqué par les auteurs, un effet cytopathique a été 25 observé dans les cellules de sang de cordon infectées, mais n'est plus détectable six semaines après l'inoculation, de sorte que ce mode de culture n'est pas satisfaisant pour une étude approfondie des caractéristiques de ce virus.

Il était donc indispensable de disposer d'un procédé pour la culture *in vitro* de cellules infectées par ce virus.

Une hypothèse a été émise et vérifiée selon 5 laquelle des cellules permissives de plexus choroïdes humains pourraient être des cellules permissives au virus retrouvé chez des patients atteints de SEP. Sur la base de cette découverte, un procédé de culture *in vitro* de cellules infectées par un virus associé à la SEP a été 10 développé.

Le procédé consiste à effectuer une culture de cellules de plexus choroïdes, obtenues après explantation post mortem de plexus choroïdes humains, dans un milieu approprié comprenant, des acides aminés, des facteurs 15 vitaminiques, des sels inorganiques et du glucose, respectivement à des concentrations pondérales totales comprises entre 400 et 2250 mg/l, 3,5 et 130 mg/l, 9100 et 13000 mg/l, et 1000 et 6000 mg/l, additionné avantageusement d'un facteur de croissance, tel qu'ECGF 20 ("Endothelial Cell Growth Factor"), pour favoriser la croissance des cellules et d'au moins un antibiotique, puis à mettre en contact les cellules de plexus choroïdes ainsi cultivées, dans leur milieu de culture, avec des cellules primaires ou dérivées, infectées ou un surnageant 25 de culture contenant le virus dans des conditions déterminées permettant la propagation du virus des cellules infectées aux cellules cultivées, sa replication et son expression.

Par cellules dérivées des cellules primaires, on 30 entend toute culture obtenue directement ou indirectement à partir desdites cellules primaires, par exemple par conservation à basse de température ou maintien de la viabilité desdites cellules. Il peut s'agir par exemple de cellules de référence déposées dans une collection.

35 Cependant, la propagation du virus à partir des quelques cellules infectées, bien qu'existante, reste

relativement restreinte au cours des passages successifs et nécessite de nombreux passages pour obtenir un niveau d'expression suffisant. La durée de vie en culture de ces cellules étant limitée, ce n'est souvent qu'aux derniers 5 passages que l'expression devient quantifiable, ce qui limite considérablement l'intérêt dudit procédé.

Les travaux des présents inventeurs les ont conduit à la mise en évidence tout-à-fait surprenante de la production d'interféron beta par les cellules de plexus choroïdes en réponse à une agression virale. Or, seuls les 10 fibroblastes, cellules épithéliales et macrophages sont connus à ce jour pour produire l'interféron beta (Interféron : Principles and Medical Applications, the University of Texas Medical Branch at GALVESTON, 15 Department of Microbiology, GALVESTON, TX, 1992). Les effets des interférons sont bien connus, et notamment ils induisent un état réfractaire des cellules à la synthèse et à la replication de matériel viral, inhibant ainsi la propagation et la production des virus en culture. Il 20 devenait alors fortement probable que la production d'interféron beta par les cellules de plexus choroïdes soit un facteur limitant déterminant dans le procédé de culture *in vitro* de cellules infectées par un virus présent chez les individus atteints de sclérose en 25 plaques.

Sur la base de cette découverte inattendue, les présents inventeurs ont mis au point un nouveau milieu de culture utilisable dans un procédé de culture *in vitro* de cellules infectées par un virus retrouvé chez des patients 30 atteints de SEP.

La présente invention a donc pour objet un milieu approprié pour la culture *in vitro* de cellules infectées par un virus présent chez les individus atteints de sclérose en plaques qui comprend, outre des acides aminés, 35 des facteurs vitaminiques, des sels inorganiques et du glucose, respectivement à des concentrations pondérales

totales comprises entre 400 et 2250 mg/l, 3,5 et 130 mg/l, 9100 et 13000 mg/l, et 1000 et 6000 mg/l, et au moins un anticorps anti-interféron beta.

Plus particulièrement, le milieu comprend au moins 5 les constituants suivants:

\* un ou plusieurs acides aminés choisis parmi les composés suivants :

arginine: 100 à 500 mg/l, de préférence 100 à 300 mg/l

cysteine et /ou cystine: 25 à 300 mg/l, de préférence

10 cystine: 25 à 100 mg/l

glutamine: 200 à 1000 mg/l, de préférence 200 à 500 mg/l

histidine : 5 à 50 mg/l, de préférence 5 à 20 mg/l

isoleucine : 20 à 100 mg/l, de préférence 20 à 60 mg/l

leucine : 20 à 100 mg/l, de préférence 20 à 60 mg/l

15 lysine : 20 à 100 mg/l, de préférence 20 à 80 mg/l

methionine : 5 à 50 mg/l, de préférence 5 à 30 mg/l

phénylalanine : 10 à 70 mg/l, de préférence 10 à 50 mg/l

thréonine : 15 à 100 mg/l, de préférence 15 à 60 mg/l

tryptophane : 2 à 30 mg/l, de préférence 2 à 25 mg/l

20 tyrosine : 10 à 70 mg/l, de préférence 10 à 50 mg/l

valine : 10 à 80 mg/l, de préférence 10 à 60 mg/l

\* un ou plusieurs facteurs vitaminiques, choisis parmi les composés suivants :

panthothenate : 0,15 à 5 mg/l, de préférence sel de 25 calcium 0,15 à 2 mg/l

choline : 0,5 à 10 mg/l, de préférence sel de chlorure 0,5 à 5 mg/l

acide folique : 0,5 à 10 mg/l, de préférence 0,5 à 5 mg/l

30 inositol : 1 à 70 mg/l, de préférence 1 à 50 mg/l

nicotinamide et/ou niacinamide : 0,5 à 10 mg/l, de préférence nicotinamide 0,5 à 5 mg/l

pyridoxine et/ou pyridoxal : 0,5 à 10 mg/l, de préférence pyridoxine/HCl 0,5 à 5 mg/l

35 riboflavine : 0,05 à 1 mg/l, de préférence 0,05 à 0,5 mg/l

thiamine : 0,5 à 10 mg/l, de préférence 0,5 à 5 mg/l

\* un ou plusieurs sels inorganiques, choisis parmi les composés suivants :

5 sels de calcium : 100 à 200 mg/l, de préférence  $\text{CaCl}_2$  anhydre

chlorure de potassium : 350 à 450 mg/l

10 sels de magnésium : 40 à 60 mg/l, de préférence  $\text{MgSO}_4$  anhydre

chlorure de sodium : 6.000 à 8.000 mg/l

15 sels de  $\text{HCO}_3$  : 2.000 à 3.000 mg/l, de préférence  $\text{NaHCO}_3$

sels de  $\text{HPO}_4$  : 600 à 1.000 mg/l, de préférence  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre

\* du glucose : 1.000 à 6.000 mg/l, de préférence D-glucose

\* anticorps anti-interféron beta : environ 10 U/ml

15 Avantageusement, les acides aminés sont choisis parmi ceux de la série naturelle L.

Le milieu peut également comprendre au moins un antibiotique, de préférence un mélange de pénicilline et de streptomycine, et si souhaité de la clindamycine pour 20 empêcher les contaminations mycoplasmiques.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le milieu comprend de plus au moins un facteur de croissance choisi parmi l'ECGF ("Endothelial Cell Growth Factor" dénommé également FGF acide) et le FGF

25 ("Fibroblast Growth Factor") basique dans des proportions variables que l'homme du métier peut déterminer à partir de ses connaissances générales des cultures cellulaires et des produits qu'il a à sa disposition. A titre d'exemple, la concentration du facteur de croissance est comprise

30 entre 1 et 50  $\mu\text{g/l}$  de milieu de culture, en présence d'héparine à une concentration comprise entre 50 et 50  $\mu\text{g/l}$ . Avantageusement, le facteur de croissance choisi est l'ECGF (10  $\mu\text{g/l}$ , en présence d'héparine comme précédemment).

35 L'invention a aussi pour objet un procédé d'obtention *in vitro* d'une culture de cellules de plexus

choroïdes humains infectées, prélevées post mortem sur le corps d'un individu ou patient atteint de SEP, selon lequel on cultive lesdites cellules prélevées dans le milieu de culture précité et dans des conditions déterminées pour obtenir une première culture de cellules primaires de plexus choroïdes, puis on cultive en série, c'est-à-dire par passages successifs, dans ledit milieu de culture un prélèvement de ladite culture de cellules primaires ou de sous-culture de cette dernière, pour obtenir une culture de cellules de plexus choroïdes infectées.

L'invention a aussi pour objet une lignée cellulaire infectée de cellules de plexus choroïdes obtenue selon le procédé décrit ci-dessus, dénommée PLI-2, conformément aux dispositions du Traité de Budapest, et déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201, ainsi que la souche virale qu'elle héberge, dénommée POL-2 et déposée à l'ECACC le même jour sous le numéro V92072202. Ces deux dépôts ont été faits sous l'empire et conformément aux dispositions du Traité de Budapest.

Avantageusement, les cellules de la lignée PLI-2 sont transfectées par un gène "immédiat-précoce" d'un virus du genre Herpèsviridae pour accroître l'expression virale dans ces cellules.

L'invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une culture cellulaire ou lignée infectée viable, ou continue, comprenant des cellules infectées par au moins une souche virale humaine associée à la SEP, qui consiste à:

- (a) cultiver des cellules humaines infectées par la souche virale, pour obtenir au moins une culture primaire ou dérivée, infectée par ladite souche,
- (b) cultiver des cellules humaines permissives, de préférence des cellules de plexus choroïdes humains non infectées obtenues selon le procédé décrit ci-

dessus, lesdites cellules permissives étant susceptibles de s'infecter et de repliquer ladite souche virale, pour obtenir au moins une culture permissive,

5 (c) cocultiver au moins un prélèvement d'une culture primaire infectée et un prélèvement d'une culture permissive, pour obtenir une première culture dérivée infectée par une autre souche virale,

10 (d) cultiver en série, c'est à dire par repiquages successifs, la première culture dérivée infectée; à cette fin, on répète au cours du temps l'étape consistant à cocultiver, par exemple pendant 5 à 8 jours, un nouveau prélèvement d'une culture permissive non infectée et un prélèvement de la première culture dérivée infectée, ou d'une sous-culture de cette dernière, pour obtenir une nouvelle sous-culture de la même première culture dérivée infectée, constituant une culture virale continue dans des cellules non immortelles.

15 20 Par culture dérivée de la culture primaire, on entend toute culture ou sous-culture obtenue directement ou indirectement à partir de ladite culture primaire, par conservation à basse température ou par exemple par maintien de la viabilité de ladite culture. Il peut s'agir 25 par exemple d'une culture de référence, déposée dans une collection..

30 Au moins l'une quelconque des étapes (a) à (d) est effectuée avec un milieu de culture contenant un anticorps anti-interféron beta.

35 Avantageusement, la culture primaire infectée est obtenue à partir de cellules humaines infectées par ladite souche virale, résultant du procédé d'obtention *in vitro* décrit précédemment, par exemple la lignée cellulaire 92072201 de l'ECACC, et/ou à partir de cellules humaines infectées par ladite souche virale, choisies dans le groupe comprenant des cellules leptoméningées, des

cellules de plexus choroïdes, des cellules myéloïdes sanguines, notamment des macrophages et monocytes, et des lymphocytes.

Préférentiellement, la culture permissive est 5 obtenue à partir de cellules humaines de plexus choroïdes.

L'invention a enfin pour objet une culture virale viable ou continue, obtenue selon le procédé ci-dessus.

Avantageusement, les cellules hébergeant ladite souche virale continue sont transfectées par au moins un 10 gène "immédiat-précoce" d'un virus du genre Herpèsviridae, pour accroître l'expression virale dans ces cellules.

L'utilisation de sérums ou d'anticorps anti-interféron beta humain a permis d'obtenir une propagation accrue des souches virales présentes dans les cellules 15 explantées à partir des pièces anatomiques, ou introduites par coculture dans des cellules de plexus choroïdes non infectées. Ainsi, l'expression globale du virus dans les cultures des cellules de plexus choroïdes a pu être augmentée et le délai d'obtention d'un signal décelable 20 après mise en culture d'isolats pathologiques a pu être raccourci. Ces effets sont attribuables à la neutralisation par les anticorps de l'interféron beta ou d'une molécule antigéniquement proche, jouant un rôle inhibiteur dans l'expression virale, produit par ces 25 cellules en présence de virus.

Par "anticorps anti-interféron  $\beta$ " on entend toute préparation contenant des anticorps d'origine mono ou polyclonale, purifiés (par exemple par chromatographie d'affinité) ou non, qui reconnaissent des épitopes 30 appartenant à l'interferon  $\beta$  humain ou à toute molécule antigéniquement analogue jouant un rôle inhibiteur dans l'expression virale.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la culture primaire infectée, avant mise en 35 contact avec les cellules permisives cultivées est

préalablement traitées par irradiation, par exemple par irradiation par des rayons X.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, on obtient plusieurs cultures primaires 5 infectées par des souches virales ou isolats de SEP respectivement différents, et pendant l'étape (b), on cocultive des prélèvements desdites cultures primaires ou de sous-cultures de ces dernières, respectivement différents. On obtient ainsi dans la culture cellulaire un 10 mélange de souches virales permettant la recombinaison inter-souches, la complémentation éventuelle de génomes défectifs et l'émergence de souches recombinées dont l'adaptabilité à certains critères peut être fortement accrue. Cela peut notamment permettre d'obtenir une souche 15 hautement adaptée à la culture *in vitro* ou d'obtenir des souches replicatives à partir de souches défectives.

L'invention concerne aussi un procédé de détection, dans un fluide biologique, d'anticorps dirigés contre un virus associé à la SEP.

20 L'invention a également pour objet un procédé de préparation vaccinale à partir de cellules infectées obtenues selon le procédé de l'invention ou du virus produit par lesdites cellules.

25 Le terme "cellules infectées" tel qu'utilisé dans la présente invention fait référence:

i) à des cellules primaires infectées obtenues à partir d'une culture de cellules directement issues d'un prélèvement de tissus ou de fluides biologiques *in vivo* ou 30 *post mortem* chez un individu, ainsi qu'aux cellules dérivées obtenues par passages de ces cellules primaires, et

ii) aux cellules secondaires infectées obtenues par coculture de cellules primaires infectées et de cellules permissives, ainsi qu'aux cellules dérivées 35 obtenues par passages de ces cellules secondaires.

Par "cellules primaires", on entend des cellules en culture provenant directement d'un prélèvement de tissus ou de fluides biologiques, et passées en culture sans aucune coculture, ni inoculation de souches virales 5 issues d'autres cellules.

Les cellules prélevées in vivo ou post mortem peuvent être toutes cellules infectées par le virus, par exemple des cellules leptoméningées isolées du liquide céphalorachidien d'un patient (H. Perron et al., Res. 10 Virol., 140, 551-561 (1989)), des cellules myéloïdes trouvées dans le sang, dans le liquide céphalorachidien, dans les tissus ou dans la moelle osseuse, en particulier des macrophages ou monocytes (H. Perron et al., The Lancet, vol. 337, 862-863, 10 avril 1991) et aussi des 15 lymphocytes (S. Haahr et al., The Lancet, vol. 337, 863-864, 6 avril 1991) ou analogues. Un autre candidat pour la préparation d'une culture de cellules primaires est représenté par les cellules de plexus choroïdes humains, qui sont présumées être un site de latence pour 20 un virus associé à la sclérose en plaques.

Le terme "macrophage(s)" fait référence à des cellules dérivant directement de monocytes sanguins, à des cellules résidant dans les tissus (par exemple microgliocytes, cellules de Küpfer) et à des cellules du 25 système réticulo endothérial, notamment les cellules de Langerhans.

Les cellules permissives sont des cellules qui peuvent s'infecter et permettre la replication d'un virus donné avec production de particules virales notamment 30 extra-cellulaires que l'on peut étudier, par exemple pour leur activité transcriptase inverse dans les surnageants.

Le terme "passage" fait référence à une culture cellulaire et correspond à la dissociation des cellules d'un flacon de culture pour les transférer dans un ou 35 plusieurs nouveaux flacons.

Il est bien connu des spécialistes que des modifications spontanées ou induites peuvent survenir dans le caryotype pendant le stockage ou les passages. Ainsi des cellules dérivées d'une lignée cellulaire de référence 5 peuvent ne pas être précisément identiques aux cultures ou cellules d'origine. De même la variabilité génétique des rétrovirus est bien connue, et une souche rétrovirale donnée peut modifier ses caractéristiques par des mutations spontanées ou induites au cours des cultures.

10 De manière générale, l'invention concerne tout matériel biologique cellulaire utilisable directement ou indirectement, à différentes fins, thérapeutique, clinique, diagnostique, ou d'analyse par exemple, comprenant :

15 - soit des cellules prélevées sur ou appartenant à une culture ou lignée cellulaire infectée par une souche virale humaine associée à la SEP, obtenue par l'un quelconque des procédés décrits précédemment, par exemple la lignée cellulaire dénommée PLI-2, déposée à 20 l'ECACC le 22 juillet 1992, sous le numéro 92072201 selon les dispositions du Traité de Budapest

- soit des cellules dérivées, obtenues en modifiant le génome desdites cellules de manière spontanée ou artificielle, mais sans altérer leur phénotype de 25 cellules infectées par un virus associé à la SEP.

Préférentiellement, le virus présent dans le matériel biologique cellulaire peut être transactivé selon le processus de transfection décrit précédemment, de manière à exprimer plus intensément, plus rapidement et/ou 30 plus complètement le virus associé à la SEP.

L'invention concerne également tout matériel biologique viral, utilisable directement ou indirectement, à différentes fins, notamment clinique, thérapeutique, diagnostique, ou analytique, ce matériel consistant :

35 - soit en une fraction virale obtenue à partir du matériel biologique cellulaire défini précédemment,

éventuellement après transactivation de l'élément viral, par exemple obtenue par séparation de particules virales à partir du surnageant de cellules infectées ou par fractionnement d'antigènes ; cette fraction virale est 5 par exemple issue de la souche virale dénommée POL-2, déposée à l'ECACC, le 22 juillet 1992 sous le numéro V 92072202 selon les dispositions du Traité de Budapest

- soit en une fraction virale dérivée desdites particules 10 virales, obtenue en modifiant le génome et/ou l'enveloppe et/ou la nucléocapside des particules virales de ladite fraction, de manière spontanée ou artificielle.

L'invention concerne également un procédé de 15 détection dans tout fluide biologique, prélevé sur le corps humain, de la présence d'anticorps dirigés contre un virus de la SEP. A cette fin, il suffit de mettre en contact un échantillon de ce fluide biologique avec, soit un extrait antigénique du matériel biologique cellulaire 20 défini précédemment, ou un extrait antigénique d'un matériel biologique viral tel que défini précédemment, ou tout ou partie d'un extrait antigénique immunologiquement analogue audit virus, obtenu par synthèse chimique ou recombinaison génétique, comprenant au moins un épitope 25 d'une souche virale associée à la SEP ; puis on recherche par tout moyen approprié, par exemple par une réaction chromogène ou chromophore, ou radioactive, la présence d'un complexe anticorps-épitope.

L'invention concerne également tout réactif 30 immunologique, notamment des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, présentant une réaction immunologique avec un extrait antigénique, naturel ou de synthèse, tel que défini précédemment.

Pour terminer, l'invention concerne également 35 toute préparation vaccinale comprenant :

- soit un extrait antigénique d'un matériel biologique cellulaire, ou d'un matériel biologique viral, tel que défini précédemment, tué, ou inactif, ou atténué,
- soit un composé immunoréactif induisant une réaction immunologique analogue à celle provoquée contre ledit extrait antigénique.

5 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence aux figures annexées dans lesquelles :

10 La figure 1, représente l'activité transcriptase inverse de particules concentrées à partir des milieux de culture de la lignée PLI-2, sédimentant sur gradient de saccharose à une densité connue pour les rétrovirus.

15 Les figures 2 à 5 représentent des particules de type rétroviral observées dans les cellules PLI-2 en microscopie électronique, après transactivation par transfection de plasmides contenant le gène ICPO ou ICP4 du virus Herpes Simplex Type 1. Les échelles sont en  $\mu\text{m}$ .

20 Plus particulièrement, la figure 2 représente une partie de cellule PLI-2 (l'échelle représentée correspond à 1  $\mu\text{m}$ ). La figure 3 représente des particules de type rétroviral correspondant à des nucléocapsides intracytoplasmiques, telles qu'observées en nombre accru après stimulation (transactivation) par le produit du gène ICPO 25 du virus Herpès Simplex Type 1. La figure 4 représente un détail à plus fort grossissement de particules intracytoplasmiques. La figure 5 représente un détail d'une particule d'aspect plus mature, dans les cellules PLI-2 stimulées par transfection avec le gène ICP4 du 30 virus Herpès Simplex Type 1.

**Exemple 1 : Mise en évidence de la production d'interféron beta par les cellules de plexus choroïdes.**

35 Des cellules de plexus choroïdes en culture in vitro infectées par la souche LM7 antérieurement décrite ont été dissociées par une solution de trypsine ou d'EDTA,

transférées dans un tube, contenant éventuellement une petite quantité de sérum de veau foetal dans le cas d'une dissociation par la trypsine de cellules résistant à l'action de l'EDTA seul, et culottées par centrifugation à 5 1600 tpm pendant 5 à 15 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu dans du tampon PBS ("Phosphate Buffer Saline"), et une goutte de suspension a été déposée dans chaque oeillère de quelques lames pour microscope. Après séchage du dépôt, les lames ont été fixées par incubation dans un 10 mélange de méthanol et d'acétone (1 volume/1 volume) à -20°C, pendant 15 minutes.

15 Alternativement, ces mêmes cellules ont été cultivées sur des lames avec alvéoles de culture (commercialisées par la Société Labtek) et, après rinçage rapide dans du PBS, fixées comme précédemment.

Plusieurs dilutions dans du PBS d'anticorps monoclonal (Boehringer Mannheim, ref. 853 577; dilutions: 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000) ou d'anticorps polyclonal (VIE 3000-ZI LA JUFFARDE 01360 BALAN FRANCE; 20 dilutions: 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000) anti-interféron beta humain ont été déposées sur les lames et incubées 3 heures à 37°C. Les lames ont ensuite été rincées quelques minutes dans deux bains successifs de PBS, puis dans un bain d'eau distillée. Après séchage des lames, des 25 dilutions appropriées d'anticorps marqués au fluorochrome, anti-IgG de souris pour le monoclonal et anti-IgG de chèvre pour le polyclonal, ont été déposées respectivement sur les lames correspondantes qui ont ensuite été incubées pendant 1 heure à 37°C. Les lames ont ensuite été rincées 30 comme précédemment et, après séchage, montées pour l'observation au microscope à fluorescence.

35 Afin de mieux visualiser les structures cellulaires environnantes, certaines lames ont été incubées environ 1 minute dans une solution de colorant "Bleu Evans", puis rincées et séchées avant montage.

On a ainsi mis en évidence la présence d'une réaction immunologique spécifique révélée par l'émission d'une fluorescence qui confirme la production d'anti-interféron beta par les cellules de plexus choroïdes.

5 Pour confirmation, des cellules de plexus choroïdes ont été infectées par un virus hautement réplicatif, selon le protocole suivant.

Des cellules de plexus choroïdes non infectées ont été mises en culture dans des flasques de type "Labtek" 10 dans le milieu décrit dans l'exemple 3 ci-après, mais en l'absence d'anticorps anti-interféron  $\beta$ .

15 Ces cellules ont ensuite été infectées par du virus Herpes simplex type 1 (HSV-1). Elles ont été ainsi été laissées une nuit après un contact d'une heure environ avec un surnageant contenant des virions HSV-1.

Le lendemain, les surnageants ont été prélevés et congelés à -80°C, et les lames constitutives des flasques sur lesquelles les cellules ont poussé ont été dégagées des alvéoles, et fixées au paraformadéhyde puis utilisées, 20 ainsi que des lames de cellules non-infectées, pour une analyse par une technique classique d'immunopéroxydase, avec des anticorps polyclonaux anti-interféron  $\beta$  (exemple : anticorps polyclonal de chèvre anti-interféron  $\beta$  humain commercialisé par VIE-3000, France) et une 25 révélation par un anticorps secondaire marqué à la péroxidase (exemple : anticorps de lapin anti-immunoglobulines de chèvre).

Il a ainsi été mis en évidence un marquage spécifique des cellules de plexus choroïdes infectées par 30 un virus hautement réplicatif tel qu'HSV-1 par les anticorps anti-interféron  $\beta$ ; ce qui n'est pas le cas des cellules non-infectées.

Ceci confirme la production d'interféron  $\beta$  par les cellules de plexus choroïde en réponse à une agression 35 virale.

**Exemple 2 : Préparation in vitro d'une culture de cellules primaires infectées par un virus présent chez un patient atteint de SEP.**

Les méthodes pour préparer des cultures de cellules primaires à partir de cellules infectées, par exemple des cellules leptoméningées, des monocytes ou des lymphocytes, et les conditions pour leur croissance in vitro sont connues de l'homme du métier (voir références ci-dessus).

**10 Exemple 3 : Préparation d'une culture de cellules infectées de plexus choroïdes humains.**

Des cellules de plexus choroïdes infectées sont obtenues après explantation post mortem de plexus choroïdes humains chez un patient. La pièce anatomique 15 prélevée stérilement est délicatement délacérée avec des pinces et placée dans une solution de trypsine pendant quelques minutes à environ 37°C. Les fragments tissulaires sont recueillis après centrifugation à basse vitesse (500 t/mn) et le surnageant est centrifugé à 16000 t/mn 20 pendant 5 à 15 mn. Le culot de centrifugation est repris dans un milieu RPMI 1640 (commercialisé par Boehringer Mannheim) comprenant : de la penicilline (200.000 U/l), de la streptomycine (200mg/l), de la clindamycine (75 mg/l), de la L-glutamine (6 mM/l), du pyruvate 1%, du sérum, de 25 préférence du sérum de veau foetal 20 à 30% décomplémenté par incubation à 56°C pendant 30 minutes, des acides aminés non essentiels 1% (Boehringer Mannheim MEM, A.A.N.E. 100X ref: 210293) et de l'anticorps anti-interféron beta humain, polyclonal tel que commercialisé 30 par VIE 3000, ou monoclonal ayant une activité neutralisante vis-à-vis de l'interféron beta (10U/ml). Avantageusement, le milieu de culture comprend de plus un facteur de croissance tel que le facteur de croissance de cellules endothéliales (ECGF) associé à de l'héparine 35 (BOEHRINGER ref. 1/79/87 : ECGF environ 1 à 20 ng/ml comprenant de l'héparine 50-150 µg/ml).

Les cellules sont maintenues dans leur milieu de culture et laissées dans une étuve à CO<sub>2</sub> jusqu'à ce que la prolifération cellulaire produise une couche confluente, c'est à dire un tapis de cellules adhérantes. A ce stade, 5 les cellules sont dissociées avec une solution d'EDTA (Versène). Les cultures de cellules sont ensuite dédoublées régulièrement aussi longtemps que le potentiel mitotique le permet. Les milieux de culture sont changés au moins deux fois par semaine et toujours le lendemain 10 d'un nouveau passage, c'est-à-dire à chaque nouvel ensemencement d'un flacon avec des cellules dissociées en suspension.

On observe une extinction progressive du pouvoir mitotique des cultures infectées après une quinzaine de 15 passages environ, ce qui est conforme aux observations faites en l'absence d'anticorps anti-interféron beta. Mais, fait jamais observé dans le procédé de culture de cellules de plexus choroïdes infectées *in vitro* dans un milieu de culture dépourvu d'anticorps anti-interféron 20 beta, quelques foyers de prolifération clonale sont progressivement apparus après le dernier passage des cellules de plexus choroïdes infectées prélevées chez un patient atteint de SEP. Trois de ces foyers ont pu être repiqués et l'un d'entre eux s'est établi en une lignée à 25 fort potentiel de pousse *in vitro*. Cette lignée a été dénommée PLI-2 par la Demanderesse.

Les surnageants de culture de cette lignée établie de cellules de plexus choroïdes infectées, d'un volume minimal de 15 ml, ont été collectés, précentrifugés à 30 10.000 tpm pendant 30 minutes pour éliminer les débris cellulaires, puis ultracentrifugés à 35.000 tpm (100000 g) pendant 2 heures pour sédimenter les particules rétrovirales. Les culots sont repris (volume final concentré environ 1.000 fois dans du tampon, Tris-HCl 35 0,05M pH 9,5) et conservés à -80°C pour un dosage

ultérieur de l'activité transcriptase inverse et la préparation de virus concentré comme décrit ci-après.

Exemple 4 : Dosage de l'activité transcriptase inverse pour le suivi de la production de particules virales de type LM7 dans le surnageant des cellules de PLI-2.

Toutes les étapes sont effectuées avec du matériel et des solutions stériles, afin d'éviter toute interférence avec des nucléases ou protéases bactériennes, notamment pendant les phases d'incubation à 37°C.

Les culots contenant les particules virales concentrées dans du Tris HCl 0,01M pH8 sont décongelés et homogénéisés. 20 µl sont prélevés et ajoutés dans un mélange réactionnel contenant : 5 µl de (Tris 0.5M + DTT 0,04M) pH 8.2, 5 µl de NaCl 0.1M, 5 µl de MgCl<sub>2</sub> 0.3M, 23 µl d'H<sub>2</sub>O bidistillée, 10 µl de NP<sub>4</sub>O 2%, 2 µl polyCm-oligodG12-18 (10 U D.O./ml ; Pharmacia) et 5 µl 3H, 3H-Guanosine-Tri-Phosphate (1 mCi/ml ; NEN). Les tubes en verre contenant les mélanges sont incubés à 37°C pendant 75 minutes. La réaction est arrêtée en ajoutant 75 µl d'une solution à +4°C contenant : 12,5 % H<sub>2</sub>O saturée avec du phosphate de sodium, 12,5 % H<sub>2</sub>O saturée avec du pyrophosphate de sodium, et 20 % d'acide Tri-Chloro-Acétique (TCA). Après 30 min. à 1 heure à 4°C, les tubes sont remplis avec une solution de TCA 5 %, vidés et rincés 5 fois avec la solution de TCA à 5 %, sur une membrane d'acétate de cellulose (Sartorius ref. 11106 25 N ; diamètre de pore : 0,45 µ ; diamètre de la membrane : 25mm) à travers laquelle les échantillons sont filtrés dans un collecteur de fractions 1125 (Millipore ; ref. XX2702550). Avant d'être enlevées, les membranes sont rincées encore une fois avec 20 ml de TCA à 5 %. Les membranes sont alors placées dans des fioles que l'on remplit de liquide scintillant (Ready-Safe, Beckman) et

l'activité est mesurée dans un compteur beta, en cpm (coups par minute) et dpm (désintégrations par minute).

Chaque échantillon est testé en triple et la moyenne des valeurs utilisée comme résultat. Si la 5 différence entre cette moyenne et l'une des mesures excède deux fois l'écart type mesuré sur des valeurs de référence, l'échantillon correspondant est testé à nouveau.

Pour vérifier que l'activité transcriptase inverse 10 est bien associée à des particules de type rétroviral, les culots de virion concentrés par ultracentrifugation des surnageants de culture sur coussin de glycérol (solution PBS + 30 % de glycérol) sont placés sur des gradients de saccharose (15 à 50 % poids/poids) et ultracentrifugés à 15 + 4°C pendant 6 à 16 H à 35.000 tpm (100.000 g) dans un rotor à godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction pour y doser l'activité transcriptase inverse comme décrit ci-dessus. Le pic spécifique d'activité est retrouvé dans la fraction de 20 densité 1,17 g/ml environ (dosage réfractométrique), ce qui correspond à une densité de sédimentation à l'équilibre connue pour les particules rétrovirales (1,16 à 1,18 g/ml) (Figure 1).

25 Exemple 5 : Transfection de cellules de la lignée PLI-2 par des gènes "immédiat-précoce" du virus de l'Herpès Simplex de Type 1.

Ainsi que cela a été montré (Perron et al. Res. Virol. 1989), le virus herpes simplex type 1 (HSV-1) 30 stimule la production de virus LM7 dans les cellules leptoméningées. Par ailleurs, HSV-1 s'avère transactiver l'expression du rétrovirus HIV par le produit d'un de ses gènes "immédiats-précoce", ICP0 ou IE1 (Chapman J.C., Harris J.D., Collins M.K.L. & Latchman, D.S. 1991, A 35 recombinant HIV provirus is synergistically activated by the HIV Tat protein and the HSV IE1 protein but not by the

HSV IE3 protein. AIDS 5, 945-950 et Mosca, J.D. Bednarik, D.P. Raj, N.B. Rosen, C.A. Sodroski, J.G. Haseltine, W.A. & Pitha, P.M. 1987. Activation of human immunodeficiency virus by herpesvirus infection : identification of a 5 region within the long terminal repeat that responds to a trans-acting factor encoded by herpes simplex virus 1. Proceedings of the National Academy of Sciences 84, 7408-7412).

Sur la base de ces constatations, les inventeurs 10 ont alors envisagé d'utiliser les gènes "immédiat-précoces" du virus HSV-1 pour accroître l'expression virale par la lignée cellulaire PLI-2. Différents plasmides contenant chacun un gène immédiat-précoce du virus HSV-1 ont donc été testés par transfection dans les cellules de 15 plexus choroïdes infectées. Il a ainsi été mis en évidence, par microscopie électronique et dosage de l'activité transcriptase inverse, que les gènes ICPO (cloné dans le plasmide pJR3) et ICP4 (cloné dans le plasmide XhoC) transactivaient fortement l'expression d'un 20 virus semblable au LM7 dans les cellules de la lignée PLI-2 (figures 2 à 5). Des particules virales d'environ 100 nm sont retrouvées dans les culots d'ultracentrifugation de surnageants de ces cultures exprimant une activité transcriptase inverse accrue.

25 Le protocole expérimental de la transfection est décrit ci-dessous.

Le plasmide pJR3 contient un fragment de restriction Pst I-SacI d'HSV-1 (nucléotides 18663 à 25066) codant pour ICPO, cloné dans un vecteur pUC9. Le plasmide 30 XhoC est un fragment de restriction Xhol d'HSV-1 (nucleotides 23028 à 33520) codant pour ICP4, cloné dans un vecteur pAT153.

La transfection est réalisée avec le Transfectam (marque enregistrée, SEPRACOR, Villeneuve la Garenne, 35 France). Le principe de cette transfection consiste en une

interaction spécifique entre une lipopolyamine cationique et l'ADN du plasmide.

Les plasmides sont dilués dans une solution stérile de NaCl 0,3 M dans la proportion de 2 µg/250 µl et de 5 à 7 µg/10<sup>6</sup> cellules. Cette solution est mélangée immédiatement avant la transfection avec le même volume d'eau bi-distillée contenant 5 µl de solution stock de Transfectam par µg de plasmide. Ce mélange Transfectam-plasmide est alors versé sur les cultures préalablement lavées avec du RPMI sans sérum (2 x 15 min.), et mélangé à un volume minimum de milieu selon l'invention, mais sans sérum de veau foetal, laissé dans les flacons de manière à couvrir la surface de la monocouche de cellules adhérentes. Les flacons de culture sont alors incubés 6 h dans une étuve avec 5 % de CO<sub>2</sub>, à 37°C. Après 6 heures, le mélange Transfectam-plasmide est prélevé et remplacé par du milieu de culture selon l'invention.

Les cellules sont réincubées dans l'étuve et les surnageants prélevés environ un jour après les 6 h de contact avec le mélange de transfection, puis chaque jour pendant une semaine. Les surnageants, dont celui qui contient le Transfectam avec le plasmide, sont conservés à -80°C, ou concentrés comme décrit dans l'exemple 6 ci-après, et utilisés par la suite comme source enrichie de virions.

L'expression des gènes ICP0 ou ICP4 dans les cellules transfectées est vérifiée par immunofluorescence indirecte avec des anticorps polyclonaux de lapin ou monoclonaux de souris contre les protéines produites par ces gènes.

**Exemple 6 : Préparation de virus purifié concentré à partir des surnageants de culture de la lignée PLI-2.**

Pour la préparation de virus concentré et purifié, un volume de surnageant obtenu selon l'exemple 3 ou 5

(entre 5 et 10 litres) est décongelé et concentré par ultrafiltration tangentielle (système Minitan, Millipore) sur une série de membranes ayant un seuil de coupure à 300000 daltons. Le concentrat est ensuite centrifugé selon 5 l'exemple 3 mais avec reprise du culot dans du tampon PBS. Les culots ainsi recueillis sont alors regroupés et déposés sur un gradient de saccharose dans un tampon PBS stérile (15 à 50% poids/poids) et ultacentrifugé à 35 000 tpm (100 000 g) pendant 6 heures à +4°C dans un rotor à 10 godets. 10 fractions sont recueillies et 20 µl sont prélevés dans chaque fraction pour y doser l'activité transcripase · inverse selon la technique précédemment décrite. Les fractions contenant le pic spécifique d'activité correspondant à une densité de sédimentation à 15 l'équilibre comprise entre 1,16 et 1,18 g/ml connue pour les particules rétrovirales sont ensuite diluées dans du tampon PBS stérile et ultracentrifugées une heure à 35000 tpm (100000 g) pour sédimerter les particules virales. Le culot de virions purifiés ainsi obtenu est 20 alors repris dans un petit volume d'un tampon adéquat pour l'utilisation ultérieure qui en sera faite (ex: Tampon Guanidium Thiocyanate pour l'extraction des ARN; PBS stérile pour le stockage à -80°C).

Alternativement, de grandes quantités de flacons 25 de cellules PLI-2 peuvent être mis en culture et les surnageants dont le volume total dépasse 2 litres à chaque changement de milieu, sont pré-centrifugés à 10000 tpm, puis directement concentrés avec le système Minitan (marque enregistrée, Millipore), sans congélation 30 intermédiaire.

**Exemple 7 : Coculture d'une lignée cellulaire infectée par un virus présent chez un individu atteint de SEP et de cellules non infectées permissives au virus.**

35 Des cellules d'une culture primaire infectées, telles que décrites dans l'exemple 2, par un virus présent

chez un individu atteint de SEP, par exemple le virus LM7, sont prélevées de leur flacon de culture, puis reprises dans un milieu de culture approprié à la coculture, c'est-à-dire le milieu de culture des cellules de plexus 5 choroïdes infectées décrit à l'exemple 3, avec un anticorps anti-interféron beta humain.

Parallèlement, des cellules de plexus choroïdes non infectées obtenues après explantation post mortem de plexus choroïdes humains sont cultivées dans les 10 conditions de l'exemple 3, c'est-à-dire avec un anticorps anti-interféron beta humain. Puis, ces cellules sont dissociées de leur flacon de culture dans une solution de trypsine-EDTA. Les cellules sont ensuite centrifugées et resuspendues dans leur milieu de culture, et sont 15 rajoutées au flacon de la culture cellulaire infectée. Le flacon est placé dans une étuve à  $\text{CO}_2$  et on laisse les cellules de plexus choroïdes adhérer et proliférer au fond du flacon contenant déjà les cellules infectées pendant 24 H. Le milieu est changé après 24 H et le mélange de 20 cellules est laissé dans l'étuve à  $\text{CO}_2$ , jusqu'à ce que la prolifération de cellules permissives de plexus choroïde produise une couche confluente, c'est-à-dire un tapis de cellules adhérentes. A ce stade, les cellules sont maintenues encore 5 à 7 jours pour assurer le transfert du 25 virus des cellules infectées aux cellules de plexus choroïdes. La culture cellulaire est ensuite dédoublée et passée dans deux nouveaux flacons qui sont réensemencés avec les cellules de plexus choroïdes dissociées en suspension, et soumises aux mêmes conditions que décrites 30 ci-dessus pour l'adhésion et la prolifération des cellules, le transfert, l'expression et la réplication du virus. Les cultures de cellules sont ensuite dédoublées régulièrement et passées aussi longtemps que le potentiel mitotique des cellules permissives le permet. Ces 35 cellules, qui hébergent et produisent un virus du type LM7 peuvent à leur tour être utilisées pour infecter de

nouvelles cellules par coculture comme décrit précédemment, et ainsi maintenir la souche virale en culture.

Les milieux de culture sont toujours changés au moins deux fois par semaine et toujours le lendemain d'un nouveau passage, c'est-à-dire à chaque nouvel ensemencement d'un flacon avec des cellules dissociées en suspension.

Préalablement à la coculture, les cellules hébergeant la souche virale peuvent éventuellement être irradiées de manière à éviter leur prolifération ultérieure au sein d'une culture nouvellement infectée. L'irradiation peut par exemple être réalisée avec une dose totale de 6.000 rad de rayons X.

On observe une extinction du pouvoir mitotique après une quinzaine de passages environ, ce qui est conforme aux observations faites précédemment en l'absence d'anticorps anti-interféron beta.

Cependant, comme mis en évidence avec la culture de cellules de plexus choroïdes infectées de l'exemple 3, quelques foyers de prolifération clonale sont apparus dans plusieurs flacons en culture, après le dernier passage. Ce même phénomène a conduit à l'apparition de cellules à fort potentiel mitotique, qui ont supplanté les cellules pré-sénescentes dans une sous-culture de la souche LM7 (dénommée LM7 PG).

Les surnageants de culture de cette lignée établie ont été collectés et congelés à -80°C selon le protocole décrit dans l'exemple 3.

Le dosage de l'activité transcriptase inverse pour le suivi des particules virales de type LM7 dans le surnageant de cellules LM7 PG a été effectué conformément au protocole expérimental décrit dans l'exemple 4, et a permis de mettre en évidence un pic d'activité spécifique dans la fraction de densité 1,17 g/ml environ, ce qui

correspond à une densité connue pour les particules rétrovirales (figure 1).

Les cellules de la lignée cellulaire LM7 PG ont ensuite été transfectées, selon un protocole identique à 5 celui décrit dans l'exemple 5, ce qui a permis de montrer que les gènes ICPO (plasmide pJR3) et ICP4 (plasmide XhOC) transactivent fortement l'expression virale dans les cellules de la lignée LM7 PG. Les particules virales produites présentent les caractéristiques des rétrovirus.

10 La préparation de virus purifié concentré est effectuée à partir des surnageants obtenus soit directement après coculture, soit par transfection des cellules de la lignée LM7 PG, avec les gènes ICPO et/ou ICP4 du virus HSV-1.

## REVENDICATIONS

- 1) Procédé d'obtention in vitro d'une culture ou lignée cellulaire infectée par une souche virale associée à la sclérose en plaques (SEP), selon lequel on effectue
  - 5 un prélèvement corporel sur un individu atteint de SEP, on cultive ledit prélèvement dans un milieu de culture favorisant la croissance des cellules infectées, pour obtenir une culture de cellules primaires infectées, et on cultive en série, c'est-à-dire par passages successifs,
  - 10 dans ledit milieu de culture, un prélèvement de la culture de cellules primaires, ou d'une sous-culture de cette dernière, pour obtenir la culture ou lignée cellulaire infectée par un virus associé à la SEP, caractérisé en ce que le milieu de culture contient en outre un anticorps
  - 15 anti-interféron beta, ou dirigé contre une molécule antigéniquement proche, jouant un rôle inhibiteur dans l'expression virale, permettant d'exprimer de manière persistante et de propager la souche virale dans la culture ou lignée cellulaire.
- 20 2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le prélèvement corporel effectué contient des cellules de plexus choroïde infectées.
- 3) Procédé d'obtention d'une culture ou lignée cellulaire infectée continue, comprenant des cellules infectées par au moins une souche virale humaine associée à la sclérose en plaques (SEP), caractérisé en ce qu'il consiste en la combinaison des étapes suivantes :
  - a) on cultive des cellules humaines infectées par une autre souche virale, pour obtenir au moins une culture primaire infectée par ladite souche virale,
  - 30 b) on cultive des cellules humaines non infectées et permisives à ladite souche virale, pour obtenir au moins une culture permissive,
  - c) on co-cultive au moins un prélèvement d'une culture primaire infectée et un prélèvement de la culture

permissive, pour obtenir une première culture dérivée infectée par une autre souche virale,

d) on cultive en série la première culture dérivée infectée, et à cette fin on répète au cours du temps  
5 l'étape consistant à cocultiver un nouveau prélèvement d'une culture permissive non infectée et un prélèvement de la première culture dérivée infectée, ou d'une sous-culture de cette dernière, pour obtenir une nouvelle sous-culture de la même première culture dérivée infectée, constituant une culture virale,  
10 continue dans des cellules non immortelles au moins l'une quelconque des étapes de culture (a) à (d) étant effectuée avec un milieu de culture contenant en outre un anticorps anti-interféron beta, ou dirigé contre  
15 une molécule antigéniquement proche, jouant un rôle inhibiteur dans l'expression virale.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la culture primaire infectée est obtenue à partir de cellules humaines infectées par ladite souche  
20 virale, choisies dans le groupe comprenant des cellules leptoméningées, des cellules de plexus choroïdes, des cellules myéloïdes sanguines, notamment des macrophages et monocytes, et des lymphocytes.

5) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la culture permissive est obtenue à partir de  
25 cellules humaines de plexus-choroïdes.

6) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'on obtient plusieurs cultures primaires infectées par des souches virales respectivement différentes, et  
30 l'étape (b) est effectuée par coculture d'un prélèvement de la culture permissive et de plusieurs prélèvements de cultures primaires ou de sous-cultures infectées respectivement différentes.

7) Milieu de culture pour la mise en oeuvre d'un  
35 procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, comprenant au moins un acide aminé, au moins un facteur

vitaminique, au moins un sel inorganique, et du glucose, caractérisé en ce qu'il contient un anticorps anti-interféron beta.

8) Milieu de culture selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend, outre l'anticorps anti-interféron beta :

- entre 400 et 2250 mg/l d'acides aminés
- entre 3,5 et 130 mg/l de vitamines
- entre 9100 et 13000 mg/l de sels inorganiques
- entre 1000 et 6000 mg/l de glucose
- éventuellement, au moins un facteur de croissance choisi parmi ECGF et FGF basique.

9) Matériel biologique cellulaire, caractérisé en ce qu'il comprend, soit des cellules prélevées sur ou appartenant à une culture ou lignée cellulaire infectée par une souche virale associée à la sclérose en plaques (SEP), obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, notamment la lignée cellulaire dénommée PLI-2, déposée à l'ECACC le 22 juillet 1992 sous le N° 92072201 selon les dispositions du Traité de Budapest, soit des cellules dérivées, obtenues en modifiant le génome desdites cellules, mais sans altérer leur phénotype de cellules infectées par un virus associé à la sclérose en plaques.

10) Procédé de transactivation d'un virus associé à la SEP présent dans un matériel biologique cellulaire selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'on transfecte dans les cellules infectées dudit matériel au moins un gène immédiat-précoce d'un virus du genre Herpèsviridae, notamment du virus HSV-1.

11) Procédé de transactivation selon la revendication 10, caractérisé en ce que le gène transfecté est le gène codant pour la protéine ICPO, et/ou le gène codant pour la protéine ICP4 du virus HSV-1.

12) Matériel biologique viral, caractérisé en ce que, soit il consiste en une fraction virale à partir du

matériel biologique cellulaire selon la revendication 9, éventuellement après transactivation selon le procédé selon la revendication 10 ou 11, notamment la souche virale dénommée POL-2, déposée à l'ECACC le 5 22 juillet 1992, sous le N° V92072202 selon les dispositions du Traité de Budapest, par exemple obtenue par séparation ou fractionnement de particules virales à partir du surnageant des cellules infectées ou par fractionnement d'antigènes, soit il consiste en une 10 fraction virale dérivée desdites particules virales, obtenues en modifiant le génome, et/ou l'enveloppe et/ou la nucleocapside des particules virales de ladite souche.

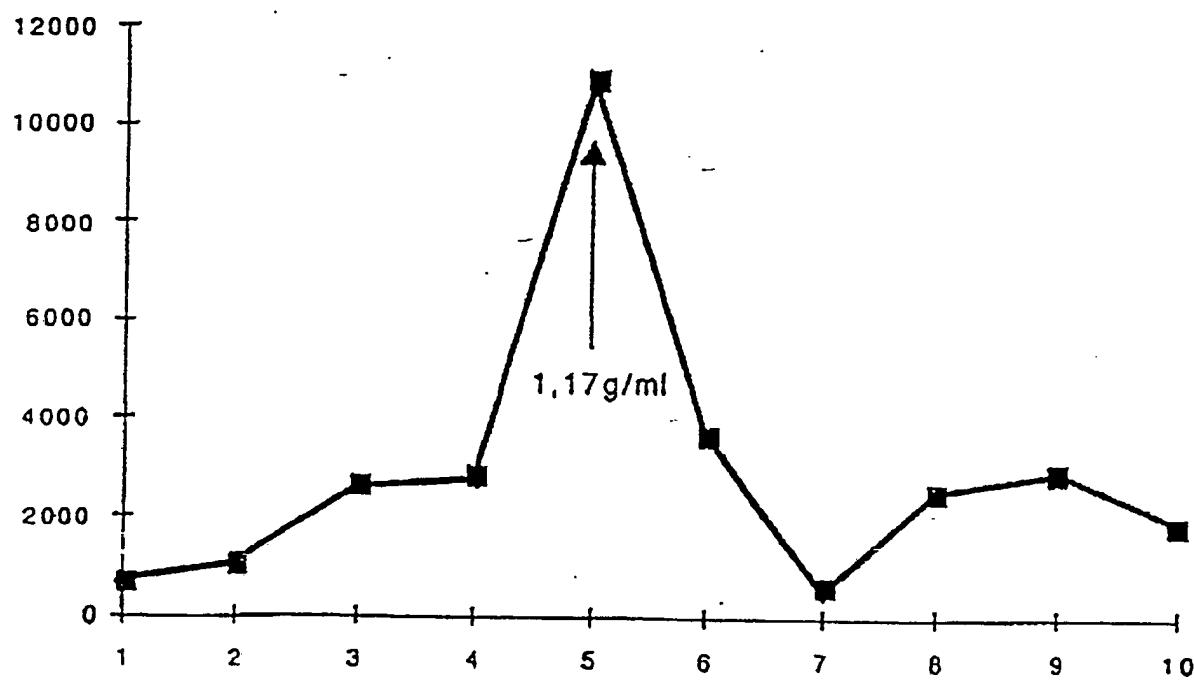
13) Procédé de détection dans un fluide biologique de la présence d'anticorps dirigés contre un virus associé. 15 à la sclérose en plaques, caractérisé en ce qu'on met en contact un échantillon dudit fluide biologique avec, soit un extrait antigénique d'un matériel biologique cellulaire selon la revendication 9, ou d'un matériel biologique viral selon la revendication 12, ou tout ou partie d'un 20 extrait antigénique immunologiquement analogue àudit virus, obtenu par synthèse chimique ou recombinaison génétique, comprenant au moins un épitope dudit virus, et on recherche la présence éventuelle d'un complexe anticorps-épitope.

25 14) Réactif immunologique, notamment anticorps monoclonal ou polyclonal, présentant une réaction immunologique avec un extrait antigénique tel que défini dans la revendication 13.

15) Préparation vaccinale, caractérisée en ce 30 qu'elle comprend, soit un extrait antigénique d'un matériel biologique cellulaire selon la revendication 9, ou d'un matériel biologique viral selon la revendication 12, tué, ou inactivé, ou atténué, soit un composé immunoréactif induisant une réaction immunologique 35 analogue à celle provoquée contre ledit extrait antigénique.

1/5

Fig 1



2/5



Fig 2

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

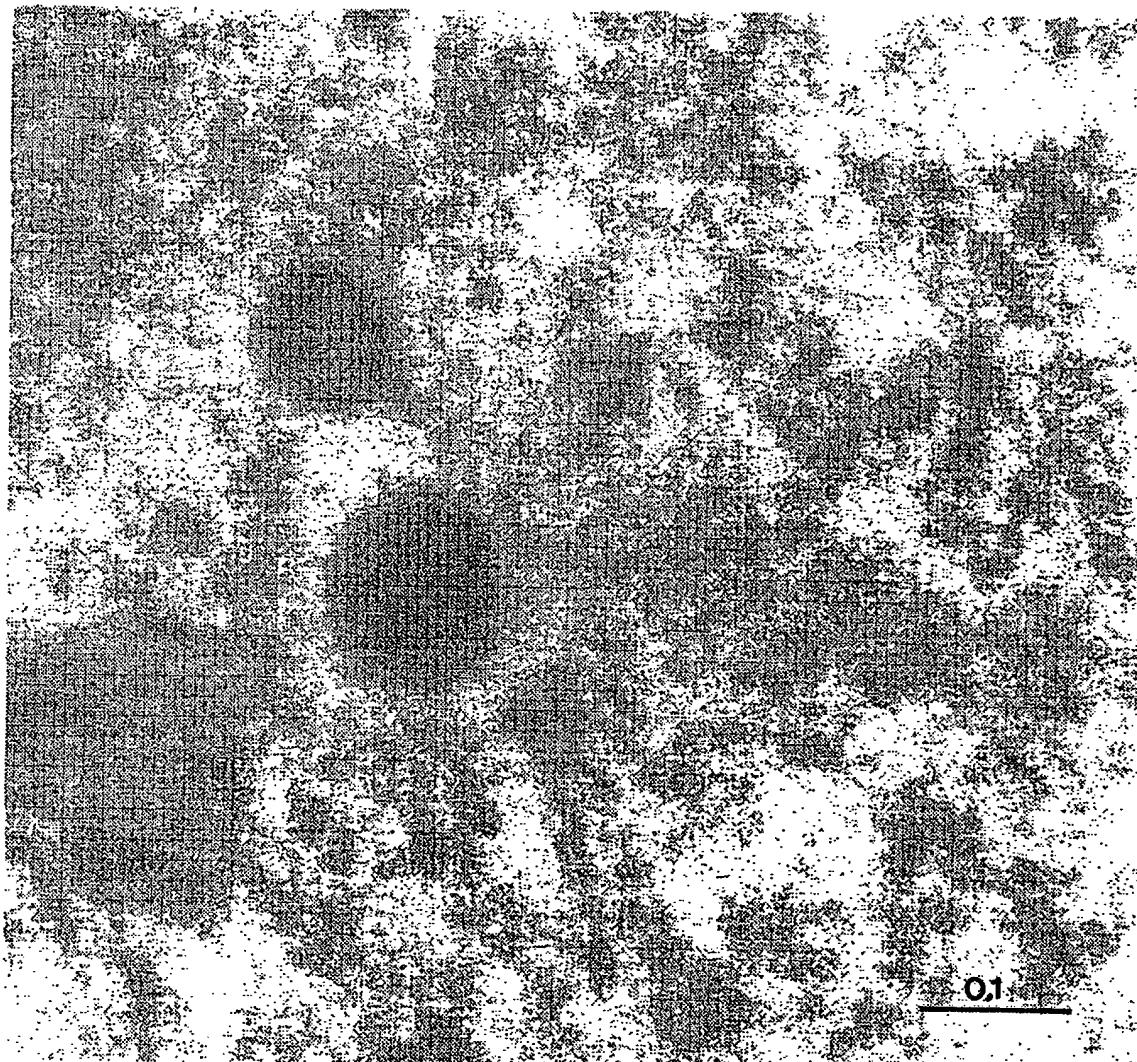
3/5



*Fig 3*

**FEUILLE DE REMplacement**

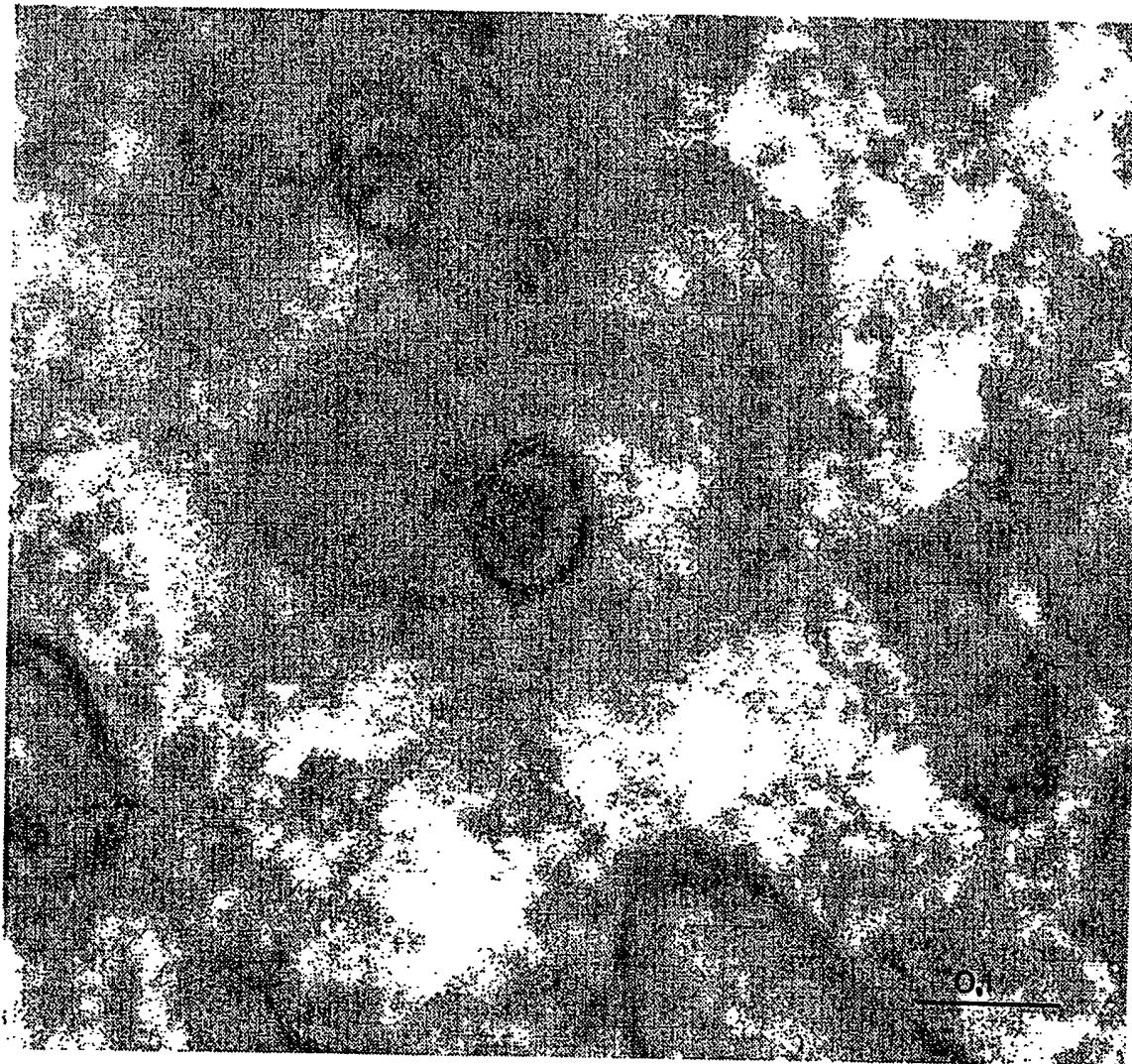
4/5



*Fig 4*

**FEUILLE DE REMPLACEMENT**

5/5



*Fig 5*

**FEUILLE DE REMplacement**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00336

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. C12N7/00; C12N5/08; C12N5/10; C12N15/38  
 C12N15/85; G01N33/569; C12P21/08; A61K39/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>5</sup> C12N ; G01N ; C12P ; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 89, No. 9    , 1 May 1990, Philadelphia, PA, US;    abstract No. 94670,</p> <p>H. PERRON ET AL. 'LEPTOMENINGEAL CELL LINE    FROM MULTIPLE SCLEROSIS WITH REVERSE    TRANSCRIPTASE ACTIVITY AND VIRAL    PARTICLES.'    page AB-568 ;    cited in the application    see abstract    &amp; RES. VIROL.    vol. 140, No. 6, 1989,    pages 551 - 562</p>	1-9, 12-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 July 1993 (14.07.93)	30 July 1993 (30.07.93)
Name and mailing address of the ISA/ <b>EUROPEAN PATENT OFFICE</b>	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00336

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	THE LANCET vol. 337, no. 8745, 6 April 1991, LONDON, GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL. 'ISOLATION OF RETROVIRUS FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS' cited in the application see the whole document ---	1-9, 12-15
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 93, no. 6 , 15 March 1992, Philadelphia, PA, US; abstract no. 67588, H. PERRON ET AL. 'ANTIBODY TO REVERSE TRANSCRIPTASE OF HUMAN RETROVIRUS IN MULTIPLE SCLEROSIS.' page AB-797 ; see abstract & ACTA NEUROL. SCAND. vol. 84, no. 6, 1991, pages 507 - 513 ---	1-9, 12-15
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 84, no. 21, November 1987, WASHINGTON US pages 7408 - 7412 J.D. MOSCA ET AL. 'ACTIVATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS BY HERPESVIRUS INFECTION: IDENTIFICATION OF A REGION WITHIN THE LONG TERMINAL REPEAT THAT RESPONDS TO A TRANS-ACTING FACTOR ENCODED BY HERPES SIMPLEX VIRUS 1.' cited in the application see the whole document ---	10,11
P,A	THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 74, no. 1, January 1993, COLCHESTER, GB pages 65 - 72 H. PERRON ET AL. 'HERPES SIMPLEX VIRUS ICP0 AND ICP4 IMMEDIATE EARLY PROTEINS STRONGLY ENHANCE EXPRESSION OF A RETROVIRUS HARBOURED BY A LEPTOMENINGEAL CELL LINE FROM A PATIENT WITH MULTIPLE SCLEROSIS.' see the whole document -----	1-15

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONAUX

Demande Internationale N°

PCT/FR 93/00336

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>9</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB 5 C12N7/00;	C12N5/08;	C12N5/10;	C12N15/38
C12N15/85;	G01N33/569;	C12P21/08;	A61K39/21

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification		
CIB 5	C12N ;	G01N ;	C12P ; A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>8</sup>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 89, no. 9  , 1 Mai 1990, Philadelphia, PA, US;  abstract no. 94670,  H. PERRON ET AL. 'LEPTOMENINGEAL CELL LINE  FROM MULTIPLE SCLEROSIS WITH REVERSE  TRANSCRIPTASE ACTIVITY AND VIRAL  PARTICLES.'  page AB-568 ;  cité dans la demande  voir abrégé  &amp; RES. VIROL.  vol. 140, no. 6, 1989,  pages 551 - 562</p> <p>---</p> <p>---</p>	1-9, 12-15

<sup>11</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  
**14 JUILLET 1993**

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

**30.07.93**

Administration chargée de la recherche internationale

Signature du fonctionnaire autorisé

**OFFICE EUROPÉEN DES BREVETS****RYCKEBOSCH A.O.**

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>15</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	<p>THE LANCET vol. 337, no. 8745, 6 Avril 1991, LONDON, GB pages 862 - 863 H. PERRON ET AL. 'ISOLATION OF RETROVIRUS FROM PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-9, 12-15
A	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 93, no. 6 , 15 Mars 1992, Philadelphia, PA, US; abstract no. 67588, H. PERRON ET AL. 'ANTIBODY TO REVERSE TRANSCRIPTASE OF HUMAN RETROVIRUS IN MULTIPLE SCLEROSIS.' page AB-797 ; voir abrégé &amp; ACTA NEUROL. SCAND. vol. 84, no. 6, 1991, pages 507 - 513</p> <p>---</p>	1-9, 12-15
A	<p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 84, no. 21, Novembre 1987, WASHINGTON US pages 7408 - 7412 J.D. MOSCA ET AL. 'ACTIVATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS BY HERPESVIRUS INFECTION: IDENTIFICATION OF A REGION WITHIN THE LONG TERMINAL REPEAT THAT RESPONDS TO A TRANS-ACTING FACTOR ENCODED BY HERPES SIMPLEX VIRUS 1.' cité dans la demande voir le document en entier</p> <p>---</p>	10,11
P,A	<p>THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY vol. 74, no. 1, Janvier 1993, COLCHESTER, GB pages 65 - 72 H. PERRON ET AL. 'HERPES SIMPLEX VIRUS ICP0 AND ICP4 IMMEDIATE EARLY PROTEINS STRONGLY ENHANCE EXPRESSION OF A RETROVIRUS HARBOURED BY A LEPTOMENINGEAL CELL LINE FROM A PATIENT WITH MULTIPLE SCLEROSIS.' voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-15